

ポリアミン代謝により産生されるアクロレインの細胞毒性機序
Cytotoxic mechanism of acrolein produced by polyamine oxidation

薬科学専攻 氏名 中村 瑞穂
英語 氏名 Mizuho Nakamura

【目的】

ポリアミン（プトレスシン、スペルミジン、スペルミン）は窒素を含む低分子の塩基性生理活性物質であり、細菌から人に至るまで生物界に広く存在する。大腸菌などの原核細胞にはプトレスシンとスペルミジンが、酵母や哺乳類などの真核細胞には主にスペルミジンとスペルミンが含まれており、細胞内には数 mM から数十 mM のオーダーで存在する。細胞内のポリアミンは主として RNA と結合して存在し、ポリアミンは RNA と相互作用することにより蛋白質合成を促進し、細胞増殖因子として機能する。その一方で、細胞障害により RNA から遊離されたポリアミンは、スペルミンオキシダーゼやアセチルポリアミンオキシダーゼにより酸化分解を受けると、毒性物質である不飽和アルデヒドのアクロレイン ($\text{CH}_2=\text{CHCHO}$) と活性酸素の一種である過酸化水素 (H_2O_2) を生じる。

当研究室では、ポリアミンより産生されるアクロレインと H_2O_2 に着目し、これらの細胞増殖に対する毒性を細胞培養系で比較したところ、アクロレインが $10 \mu\text{M}$ で増殖阻害を起こすのに対し、 H_2O_2 では $200 \mu\text{M}$ で同程度の増殖阻害をすることから、アクロレインが非常に強い毒性を示すことが明らかとなった (Fig. 1)。また、細胞障害に起因する脳梗塞や腎不全患者の血液中に蛋白質抱合型アクロレイン (PC-Acro) が増加することが見出され、細胞障害には活性酸素よりもアクロレインが強く関与していることが示唆された。脳梗塞モデルマウスを用いた実験では、梗塞巣の PC-Acro が約 30 倍上昇するのに対し、活性酸素由来の蛋白質抱合型 4-ヒドロキシノネナルや 8-ヒドロキシデオキシグアノシンは 2 倍程度しか上昇しなかった。さらに、国内で脳保護剤として使用されているフリーラジカルスカベンジャーのエダラボン (ラジカット) は、梗塞作成時に投与すると梗塞巣を小さくしたが、梗塞 6 時間後投与では無効であったのに対し、アクロレイン除去剤である *N*-ベンジルヒドロキシルアミンは梗塞時ばかりでなく、梗塞 6 時間後投与でも梗塞巣を小さくする効果が認められた。従って、アクロレインによる細胞障害が梗塞の悪化に強く関与することが明らかとなり、アクロレイン除去が脳梗塞の治療に有効であることが示された。

しかしながら、アクロレインの細胞毒性機序は未だに不明な点が多い。これまでに、アクロレインは蛋白質中のシステイン、リジン、ヒスチジン残基に選択的に反応し、ADP/ATP トランスロカーゼ 1 やアクチンなどが不活化されることが報告されている。これら蛋白質のアクロレイン修飾及び不活化は、いずれも細胞増殖阻害に直接関与しておらず、*in vitro* で確認されているのみである。本研究では、細胞レベルでのアクロレインの毒性機序を明らかにすることを目的とし、1) アクロレイン耐性細胞の樹立及びその耐性機構の解析、2) アクロレイン抱合蛋白質の同定及びアクロレイン抱合による細胞毒性機序の解明を試みた。

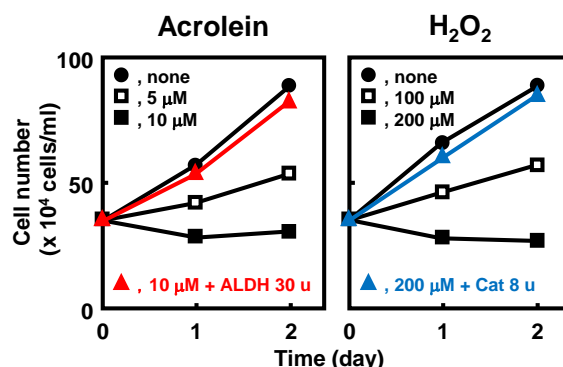


Fig. 1 アクロレイン及び過酸化水素の細胞毒性

【方法及び結果】

1. アクロレイン耐性細胞の樹立及びその毒性解除機構の解明

1) アクロレイン耐性細胞 FM3A-ATD の樹立

アクロレインの代謝はグルタチオンやアルデヒドデヒドロゲナーゼにより行われていることが知られている。アクロレインの毒性解除に重要な因子を解明するため、アクロレイン耐性細胞の樹立を試みた。対数増殖期のマウス乳がん細胞 (FM3A) を変異導入剤 Ethylmethanesulfonate で処理し、段階的に培地中のアクロレイン濃度を上昇させ、耐性細胞を取得した。樹立した耐性細胞を FM3A-ATD (acrolein toxicity-decreasing FM3A) と命名した。FM3A-ATD のアクロレインに対する感受性を FM3A と比較したところ、FM3A 及び FM3A-ATD の細胞増殖に対するアクロレインの IC_{50} (50%阻害濃度) はそれぞれ $2.6 \mu\text{M}$ と $7.6 \mu\text{M}$ を示し、耐性株では IC_{50} が約 3 倍に上昇した。

細胞内の主なチオール化合物であるグルタチオンを測定した。その結果、細胞内グルタチオン量は FM3A においては $47.2 \text{ nmol/mg protein}$ 、FM3A-ATD においては $98.9 \text{ nmol/mg protein}$ を示し、約 2 倍増加した (Fig. 2A)。したがって、FM3A-ATD では細胞内グルタチオン量の増加によりアクロレインの細胞毒性を減少させていることが示唆された。

グルタチオンは、律速酵素である γ -グルタミルシステインリガーゼ (GCL) とグルタチオンシンターゼ (GSHS) の 2 段階反応により産生されることが知られている。FM3A-ATD では細胞内グルタチオン量が増加していたことから、これら 2 種の酵素の蛋白質及び mRNA 発現量を測定した。FM3A と比較すると FM3A-ATD では GCLC (GCL catalytic subunit) の蛋白質発現量が約 2 倍に増加したが、mRNA 発現量には変化が見られなかった。したがって、FM3A-ATD は GCLC の蛋白質発現量の増加により細胞内グルタチオン量が増加したことが示唆された。そこで GCLC mRNA の塩基配列を決定したところ、FM3A では完全長のものと exon-7 の欠落したものが同程度認められたのに対し、FM3A-ATD の GCLC mRNA は完全長のみが認められ、FM3A の完全長と同一の配列が確認された。これらの結果より、FM3A は GCLC 遺伝子の対立遺伝子の一つが不活化し mRNA の半分が機能しないのに対し、FM3A-ATD はこれが再活性化したために GCLC 蛋白質発現量が 2 倍に増加したことが明らかとなった。

2) アクロレイン耐性細胞 Neuro2a-ATD の樹立

FM3A の GCLC 遺伝子は、対立遺伝子の一つが不活化しており、再活性化によりアクロレイン耐性が得られることが明らかとなった。そこで、他の細胞株を用いて、同様にアクロレイン耐性細胞の樹立を行い、アクロレインの耐性獲得にグルタチオンが関連するかどうかを検討した。マウス神経芽細胞腫 Neuro2a を、FM3A と同様に変異原処理を行い、得られたアクロレイン耐性細胞を Neuro2a-ATD と命名した。Neuro2a-ATD のアクロレインに対する感受性を Neuro2a と比較したところ、Neuro2a 及び Neuro2a-ATD に対するアクロレインの IC_{50} はそれぞれ $4.2 \mu\text{M}$ 、 $8.4 \mu\text{M}$ を示し、耐性株では IC_{50} が約 2 倍増加した。

FM3A と同様に細胞内グルタチオン量を測定したところ、Neuro2a は $20.4 \text{ nmol/mg protein}$ であったのに対し、Neuro2a-ATD は $33.9 \text{ nmol/mg protein}$ であり、約 1.5 倍上昇した。 (Fig. 2B)。これらの結果から、アクロ

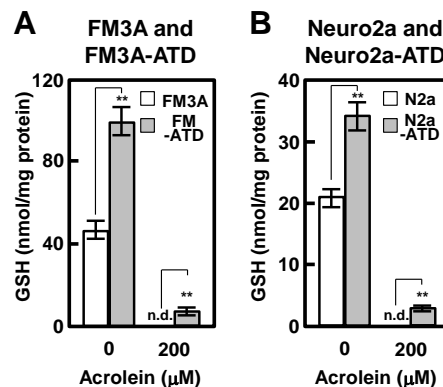


Fig. 2 アクロレイン耐性細胞における細胞内グルタチオン量の増加

レイン毒性に対する耐性獲得には細胞内グルタチオンの増加が重要であることが示された。

Neuro2a-ATD において、細胞内グルタチオン量が増加するメカニズムを解明するため、グルタチオンの生合成酵素について解析した。Neuro2a と比較して、Neuro2a-ATD では GCLC 及び GSXS の蛋白質及び mRNA 発現量が増加し、これらの酵素が転写レベルで増加していることが明らかとなった。GCLC 及び GSXS の転写促進には、AP-1 や NF- κ B のリン酸化の関与がこれまでに報告されている。そこで AP-1 の主な構成蛋白質である c-Jun 及び NF- κ B p65 について調べたところ、Neuro2a-ATD では c-Jun 及び NF- κ B p65 の活性型（リン酸化型）である phospho-c-Jun 及び phospho-NF- κ B p65 が有意に増加していた。さらに、c-Jun 及び NF- κ B のリン酸化は c-Jun N 末端キナーゼ（JNK）が担っていることが報告されており、Neuro2a-ATD では、活性型である phospho-JNK が増加していた。以上の結果から、Neuro2a-ATD はリン酸化による JNK の活性化を介してグルタチオン生合成酵素の活性が上昇し、細胞内グルタチオン量が増加したことが明らかとなった。

2. アクロレイン抱合蛋白質の同定及びアクロレイン抱合の細胞増殖に対する影響

1) アクロレイン抱合蛋白質の同定

アクロレインは DNA よりも蛋白質に対して障害を起こすことが明らかとなっている。本研究では、アクロレインの標的蛋白質を同定するため、以下の検討を行った。40 μ M のアクロレインで 9 時間処理した FM3A を回収・分画し、SDS-ポリアクリルアミド電気

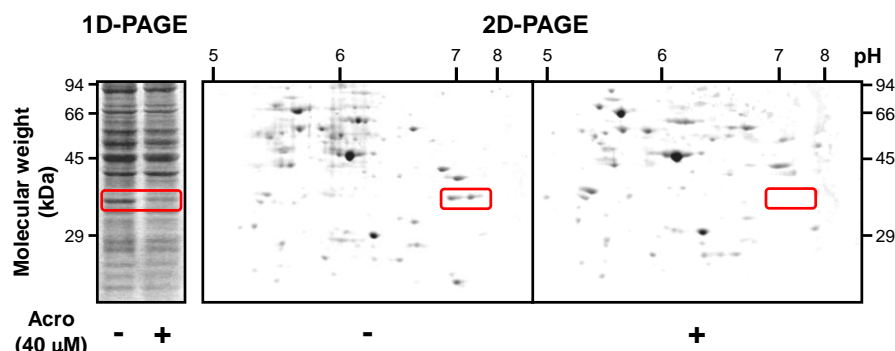


Fig. 3 アクロレイン処理による蛋白質の消失

泳動を行ったところ、アクロレイン処理により 37 kDa 付近の蛋白質が減少していることを見出した (Fig. 3)。そこで、アクロレイン未処理の細胞より得られた蛋白質を LC-MS/MS を用いて解析した結果、この蛋白質はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）と同定された。

次に GAPDH 上のアクロレイン抱合部位の同定を試みた。アクロレイン処理した細胞より得られた GAPDH を LC-MS/MS で解析した結果、活性中心である Cys-150 残基及び Cys-282 残基の 2 つのシステイン残基にアクロレインが抱合することが明らかとなった。他のシステイン、リジン及びヒスチジン残基にはアクロレイン抱合は見られなかった。

2) GAPDH に対するアクロレインの影響

GAPDH の活性中心である Cys-150 残基にアクロレインが抱合することから、GAPDH 活性が低下していることが考えられる。そこで、低濃度のアクロレイン（4 及び 8 μ M）存在下 FM3A を培養し、細胞増殖阻害と GAPDH 活性及び細胞内 ATP 量の変化を検討した。4 μ M アクロレイン存在下では増殖速度の低下を起こすのみであったが、8 μ M アクロレインでは細胞増殖が停止した。GAPDH は 4 μ M アクロレイン存在下では一過的に活性が低下するが、24 時間後には回復するのに対し、8 μ M アクロレイン存在下では 6 時間後には GAPDH 活性が著しく低下し、回復が認められなかった。細胞内 ATP 量は 8 μ M アクロレイン存在下で 24 時間後に顕著に減少した。

アクロレインによる細胞生存率の減少に GAPDH 活性の低下が関与しているかどうかを検討するため、

GAPDH を過剰産生させた細胞のアクロレインに対する感受性の変化を検討した。その結果、none、vector、GAPDH 過剰産生株に対するアクロレインの IC₅₀ はそれぞれ 2.7 μM、2.9 μM、4.3 μM を示し、GAPDH 過剰産生株の細胞生存率は部分的に回復した。以上の結果から、アクロレイン抱合 GAPDH がアクロレインによる細胞増殖阻害の一因であることが明らかとなった。

3) アクロレイン抱合 GAPDH の局在及びアポトーシス惹起作用

一酸化窒素 (NO) が GAPDH の Cys-150 残基に結合し、GAPDH が S-ニトロシル化されると、不活化され、E3 ユビキチンリガーゼである Siah とともに核内移行し、P300/CBP の活性化により GAPDH がアセチル化を受け、アポトーシスを引き起こすことが知られている。そこで、アクロレイン処理した際の GAPDH の局在を調べた。8 μM アクロレイン存在下で 6 時間培養した FM3A を分画し、Western blotting により検討した結果、アクロレイン添加により GAPDH の細胞質から核への移行が認められた。また、免疫染色法でもアクロレイン添加による GAPDH の細胞質から核への移行を確認した。さらにアクロレイン存在下培養した細胞における GAPDH のアセチル化を、アセチルリジンに対する抗体で免疫沈降を行い、Western blotting により GAPDH の検出を試みた。アクロレイン存在下培養した細胞では、核に局在する GAPDH のアセチル化の増加が見られた。これらの結果から、アクロレイン抱合 GAPDH は S-ニトロシル化 GAPDH と同様に核へ移行し、アセチル化されることが明らかとなった。

さらに、TUNEL assay を行い、アポトーシス惹起作用について検討した。FM3A を 8 μM アクロレインで 24 時間培養したところ、TUNEL 陽性細胞の割合が顕著に増加したことから、アクロレイン抱合 GAPDH が p300/CBP によりアセチル化を受け、S-ニトロシル化 GAPDH と同様にアポトーシスを引き起こすことが示唆された。

【結論】

本研究では、アクロレイン耐性細胞 FM3A-ATD 及び Neuro2a-ATD を樹立し、アクロレイン毒性の解除にグルタチオンが重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、アクロレイン標的蛋白質の一つとして GAPDH を同定し、アクロレインは GAPDH の活性中心である Cys-150 残基及び Cys-282 残基に抱合することを見出した。アクロレインは細胞内 ATP 量を減少させると共に、GAPDH を不活化することで細胞死を引き起こし、これがアクロレインの細胞毒性機序の一つであることを明らかにした。

【文献】

- 1) Tomitori, H., Nakamura, M., Sakamoto, A., Terui, Y., Yoshida, M., Igarashi, K. & Kashiwagi, K. “Augmented glutathione synthesis decreases acrolein toxicity”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 40, no. 1, pp.110-115. (2012)
- 2) Nakamura, M., Tomitori, H., Suzuki, T., Sakamoto, A., Terui, Y., Saiki, R., Dohmae, N., Igarashi, K. & Kashiwagi, K. “Inactivation of GAPDH as one mechanism of acrolein toxicity”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press